

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21620121152440

UDC _____

廈門大學

硕 士 学 位 论 文

组蛋白乙酰基转移酶 Gcn5 自乙酰化位点的
鉴定

Identify the Specific Site for Autoacetylation of Histone

Acetyltransferase Gcn5

余 姣

指导教师姓名: 韩爱东教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2015 年 4 月 6 日

论文答辩时间: 2015 年 5 月 15 日

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月

摘要

赖氨酸乙酰化是一种非常重要的转录后蛋白质修饰，如组蛋白乙酰化修饰。乙酰化修饰不仅参与调控基因转录、细胞周期、细胞凋亡和发育，而且在肿瘤的发生、记忆以及能量代谢中发挥重要作用。组蛋白乙酰化酶 PCAF (p300/CBP 相关因子) 和 Gcn5 (组蛋白乙酰化酶合成通用控制蛋白 5) 都属于 GNAT 家族，因它们都具有保守的催化结构域故统称为 HAT。PCAF/Gcn5 主要存在于细胞核内，这样的核定位是由 HAT 结构域毗连的保守区域自乙酰化状态所决定。然而，自乙酰化在其他同源蛋白中是否也是保守的还不清楚。我们克隆了文昌鱼 Gcn5 (bbGcn5)，并且在大肠杆菌系统中成功表达了包含有 HAT 结构域和毗连保守区域的文昌鱼 Gcn5 片段(399-662)。通过体外乙酰化反应，我们发现 bbGcn5 具有类似的自乙酰化现象。进一步的系列突变实验确定 K425 是发生自乙酰化的主要位点，K422 对自乙酰化也有一定的影响。这种位点特异性的自乙酰化现象与之前文献的报道存在差异。为了揭示 bbGcn5 自乙酰化位点特异性的机制，我们尝试了三种不同的猜想。第一个猜想是 bbGcn5(399-472)与 bbGcn5(471-662)之间的相互作用决定自乙酰化位点。我们表达了带有不同标签的这两个蛋白片段，进行 pulldown 实验，但是完全检测不到两者间的相互作用。第二个猜想是 K425 附近的氨基酸可能形成一个 HAT 结构域特异识别的序列。然而，实验结果表明 K425 侧边氨基酸的突变对 bbGcn5 的自乙酰化程度几乎没有影响。最后，我们尝试解析出 bbGcn5 的晶体结构。我们成功获得了 bbGcn5 的晶体和高分辨率的 X 射线衍射数据。然而，通过蛋白质质谱分析实验，我们发现这些晶体实际上只含有 bbGcn5 HAT 结构域的 N 端区域。虽然我们还不能解释这种位点特异性的分子原理，但是我们的发现对于进一步研究体内 PCAF/Gcn5 自乙酰化如何调控它们的细胞核定位具有重要意义。

关键词：自乙酰化；Gcn5；文昌鱼

Abstract

Lysine acetylation is one of very important posttranslational modifications in proteins, including histones. It regulates gene transcription, cell cycle, apoptosis and development, and plays a role in tumorigenesis, memory and energy metabolism. PCAF (p300/CBP associated factor) and Gcn5 (General control nonderepressible-5) are histone acetyltransferases in GNAT (Gcn5-related N-acetyltransferase) family, which have a conserved catalytic domain so called HAT (histone acetyltransferase). PCAF/Gcn5 mainly accumulate in nucleus, which is controlled by their autoacetylation state in a conserved region adjacent to the HAT domain. However, whether autoacetylation is conserved in other Gcn5 homologues is not known. We cloned a Gcn5 homologue from Branchiostomid (bbGcn5) and successfully expressed in *E. coli* a fragment (399-662) that contains a HAT domain and adjacent conserved region. We found that the same autoacetylation phenomenon has occurred *in vitro* using the purified bbGcn5 protein. Interestingly, our further mutagenesis identified a key acetylation site K425 and partial acetylation site K422, which are contradicted with those reported in current literature. In order to understand the mechanism of site-specific autoacetylation, we tested three hypotheses. First hypothesis is that acetylation sites are determined by any specific interactions between Gcn5(399-472) and Gcn5(471-662). We expressed both these fragments in different tags and performed reciprocal pulldown experiments. Unfortunately, no interaction could be detected. Second hypothesis is that the amino acids sequences around lysine sites might form a specific site for HAT recognition. However, mutation of a series of characteristic residues flanking the lysine did not seem to change autoacetylation states of bbGcn5. Lastly, we attempted to solve the crystal structure of bbGcn5. We successfully obtained its crystals and the high-resolution data. However, we found the crystal only contains partial bbGcn5 fragment, only N terminal part of HAT domain identified using mass spectrometric analysis. Together, we discovered a site-specific autoacetylation in bbGcn5. Although we have not been able to find molecular bases for such specificity, our discovery should be useful to further our understanding for

how PCAF/Gcn5 autoacetylation regulates their nuclear localization *in vivo*.

Keywords: autoacetylation; Gcn5; Branchiostomid

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

摘要.....	III
Abstract.....	IV
目 录.....	VI
Contents.....	IX
第一章 前言	1
1.1 组蛋白的修饰	1
1.2 组蛋白乙酰转移酶的研究进展	3
1.2.1 组蛋白乙酰转移酶的研究.....	3
1.2.2 PCAF.....	6
1.2.3 Gcn5.....	7
1.3 乙酰化修饰功能的研究	8
1.3.1 组蛋白乙酰化修饰与基因转录.....	8
1.3.2 组蛋白乙酰化修饰与细胞周期.....	9
1.3.3 组蛋白乙酰化修饰与心脏发育.....	9
1.3.4 乙酰化修饰与疾病.....	10
1.3.5 乙酰化修饰与新陈代谢.....	11
1.4 自乙酰化修饰	12
1.4.1 Tip60 自乙酰化修饰.....	12
1.4.2 PCAF 和 p300 自乙酰化修饰.....	12
1.5 本论文的例题依据与研究内容	13
第二章 材料与方法	15
2.1 材料与试剂	15
2.1.1 基因与蛋白.....	15
2.1.2 菌种.....	15
2.1.3 质粒.....	15
2.1.4 工具酶.....	17

2.1.5 抗体.....	17
2.1.6 试剂.....	18
2.1.7 主要使用仪器.....	19
2.2 方法.....	20
2.2.1 PCR 相关实验	20
2.2.2 定点突变.....	22
2.2.3 感受态细胞的制备.....	24
2.2.4 DNA 的纯化、转化、与抽提.....	25
2.2.5 工具酶对质粒 DNA 的处理	27
2.2.6 重组蛋白的表达.....	28
2.2.7 重组蛋白的分离纯化.....	29
2.2.8 电泳与染胶.....	33
2.2.9 体外乙酰化.....	35
2.2.10 蛋白免疫印迹.....	36
2.2.11 GST-pulldown 实验	36
2.2.12 蛋白质晶体生长.....	37
2.2.13 试剂配方.....	40
第三章 结果与讨论.....	45
3.1 bbGcn5 自乙酰化的位点特异性.....	45
3.2 bbGcn5 自乙酰化位点特异性的分析.....	49
3.2.1 bbGcn5(399-472)与 bbGcn5(471-662)的相互作用	49
3.2.2 bbGcn5 自乙酰化的保守基序	50
3.3 bbGcn5 结构的研究.....	52
3.3.1 bbGcn5(405-662)与 bbGcn5(399-662)融合蛋白表达质粒的构建	52
3.3.2 bbGcn5(405-662)融合蛋白的表达与纯化	53
3.3.3 bbGcn5(399-662)融合蛋白的表达与纯化	60
3.3.4 bbGcn5 蛋白晶体.....	63
3.4 小结与讨论.....	70
附录 1 图表索引.....	72

附录 2 缩略语及中英文对照.....	73
参考文献.....	74
致谢.....	81

厦门大学博士论文摘要库

Contents

Abstract in Chinese	III
Abstract in English	IV
Contents in Chinese	VI
Contents in English	IX
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Modification of histone	1
1.2 Histone acetyltransferase	3
1.2.1 Classification of histone acetyltransferase	3
1.2.2 PCAF	6
1.2.3 GCN5	7
1.3 Function of acetylation	8
1.3.1 Histone acetylation and gene translation	8
1.3.2 Histone acetylation and cell cycle	9
1.3.3 Histone acetylation and heart development	9
1.3.4 Acetylation and disease	10
1.3.5 Acetylation and metabolism	11
1.4 Autoacetylation	12
1.4.1 Autoacetylation of Tip60	12
1.4.2 Autoacetylation of PCAF and p300	12
1.5 Significance and content of the thesis	13
Chapter 2 Material and method	15
2.1 Material and reagent	15
2.1.1 gene and protein	15
2.1.2 Bacterial strain	15
2.1.3 Plasmid	15
2.1.4 Enzyme	17

2.1.5 Antibody.....	17
2.1.6 Reagent.....	18
2.1.7 The main use of instruments	19
2.2 Method	20
2.2.1 PCR related experiment	20
2.2.2 Site-specific mutagenesis	22
2.2.3 Preparation of competent cells	24
2.2.4 Purification, transfer and extraction of DNA.....	25
2.2.5 Digestion of DNA	27
2.2.6 Expression of recombinant protein	28
2.2.7 Purification of recombinant protein	29
2.2.8 Electrophoresis and gel staining	33
2.2.9 Acetylation in vitro	35
2.2.10 Western blot	36
2.2.11 GST-pulldown	36
2.2.12 Protein crystalization.....	37
2.2.13 Protocol of reagent.....	40
Chapter 3 Results and analysis	45
3.1 Discovery of specific-site for bbGcn5 autoacetylation.....	45
3.2 Analysis of bbGcn5 autoacetylation	49
3.2.1 Interaction between bbGcn5(399-472) and bbGcn5(471-662).....	49
3.2.2 Conserved sequence of bbGcn5 for autoacetylation.....	50
3.3 Structure of bbGcn5	52
3.3.1 Consturction of plasmid bbGcn5(405-662) and bbGcn5(399-662).....	52
3.3.2 Expression and purification of bbGcn5(405-662)	53
3.3.3 Expression and purification of bbGcn5(399-662)	60
3.3.4 Crystalizaion of bbGcn5	63
3.4 Conclusion and discussion.....	70
Appendix 1 Index of chart	72

Appendix 2 Abbreviation	73
Reference	74
Acknowledge	81

厦门大学博士论文摘要库

第一章 前言

1.1 组蛋白的修饰

表观遗传学是一种非基因的获得性遗传，它是生命科学研究最热门领域之一。它是对以 DNA 为主体的中心法则信息传递方式的有益而又重要的补充。组蛋白的修饰方式多种多样，与多种酶有关，并且各种修饰之间存在相互的影响。组蛋白翻译后修饰一方面与染色体结构的重塑与功能有关，另一方面这些修饰参与了细胞的生长、命运，以及癌症的发生^[1]，例如细胞有丝分裂、死亡，DNA 的损伤修复、复制以及重组过程与组蛋白发生磷酸化修饰间有直接的作用^[2]，具体如表格 1 所示。

表格 1 核心组蛋白修饰与功能^[6, 7]

Table 1 The modification of histone and its function

组蛋白	修饰位点	修饰种类	形成的蛋白复合体	功能	识别的结构域
H2A	S1	磷酸化	MSK1	抑制基因转录	
	K5	乙酰化	p300	激活基因转录	
	K119	泛素化	hPRC1L	参与 ploycomb 沉默	
H2B	K5	乙酰化	p300	激活基因转录	
	K12	乙酰化	p300	激活基因转录	
	S14	磷酸化	Mst1	细胞凋亡，DNA 修复	
	K15	乙酰化	p300	激活基因转录	
	K20	乙酰化	p300	激活基因转录	
	S33	磷酸化	TAF1	细胞周期演进和发育	
	K123	泛素化	Ubc2	调节 H3K4 甲基化	
H3	R2	甲基化	CARM1		

	T3	磷酸化	Haspin	细胞分裂染色 体排列	
	K4	甲基化	Set1 / MLL / Ash1	基因转录的激 活	PHD / Chromo / WD40 / ADD
	R8	甲基化	PRMT5	调节细胞生长 和增生	
	K9	甲基化	SUV39h1 / 2	染色质结构的 调节	Chromo / PHD / Tudor / WD40
	S10	磷酸化	RSK2 / MSK1	细胞分裂与凋 亡	
	T11	磷酸化	DIK/ZIP	细胞分裂	
	K14	乙酰化	p300 / PCAF	基因转录的激 活	TandemPHD / Tandem Bromo
	R17	甲基化	CARM1	激活基因转录	Tudor
	K18	乙酰化	p300	激活基因转录	
	K23	乙酰化	p300	激活基因转录	Chromo
	K27	甲基化	Eed - Ezh 2	X 染色体失活	Chromo / WD40
	S28	磷酸化	Aurora / PKA	细胞分裂与凋 亡	
	K36	甲基化	NSD1	基因转录的激 活	Chromo / PWWP
	K79	甲基化	Dot1L/Dot1 p	端粒沉默	Tudor
H4	S1	磷酸化	CKII	DNA 损伤修复	
	R3	甲基化	PRMT1 / PRMT5	染色质的活化	Tudor / ADD
	K5	乙酰化	p300	激活基因转录	Bromo
	K8	乙酰化	p300 / PCAF	基因转录的激 活	Bromo

	K12	乙酰化	p300	激活基因转录	
	K16	乙酰化	hMOF	激活基因转录	Bromo
	K20	甲基化	PR-Set7/NS D1	基因沉默, DNA 修复	Tudor/WD40/MBT/P WWP

与原核生物不同的是真核生物的 DNA 大都是以高度折叠的、结构复杂的染色质为基础,这使得原核与真核生物在基因表达方面有一定的差异^[3]。两分子 H2A-H2B 二聚体,两分子 H3 和两分子 H4 构成一个八聚体,即核小体,各个核小体上缠绕长约 146bp 的 DNA (约 1.75 圈)。核小体之间以 40 至 60bp 的 DNA 相互连接,而组蛋白 H1 则与核小体的连接 DNA 结合。组蛋白的氨基端在球状八聚体中处于游离状态,游离的氨基酸序列称为组蛋白的氨基端尾巴,简称为组蛋白尾巴。核小体是染色质的基本组成单位,经过螺旋形成螺线管,螺线管经过盘绕和压缩过程形成超螺线管染色单体^[4]。组蛋白尾巴是组蛋白发生各种修饰的主要区域,尾巴上不同残基的不同修饰组合形成不同的信号,这种信号好似密码,不同的目标蛋白识别特异性密码,使得相关蛋白的生物学活动受到影响,从而达到调控真核生物的基因表达,这就是所谓的“组蛋白密码”学^[5]。修饰位点就是组蛋白上能够发生共价修饰的氨基酸残基。组蛋白翻译后修饰位点通常位于 4 种常见的核心组蛋白 H2A、H2B、H3、H4 氨基端尾巴上。乙酰化、泛素化、磷酸化、ADP-核糖基化、SUMO 修饰和甲基化是目前研究比较多的组蛋白共价修饰^[5]。相关蛋白的不同修饰可调控其与 DNA 的结合,例如乙酰化使得组蛋白尾巴所带正电荷减少,从而减弱了其带负电荷 DNA 骨架的相互作用,使得染色质呈开放状态,有利于转录激活,去乙酰化则反之;甲基化通常会导致目的基因沉默,去甲基化修饰则相反。

1.2 组蛋白乙酰转移酶的研究进展

1.2.1 组蛋白乙酰转移酶的研究

Gcn5和PCAF是研究较多且较深入的乙酰基转移酶,它们都具有乙酰基转移酶活性,并且能够同p300和CBP有相互作用^[8], Gcn5和PCAF间有70%的一致性和80%的相似性。早在1964年ALLFREY等就发现基因的活性受到组蛋白乙酰化

修饰的影响。后续关于基因转录活性受到组蛋白乙酰化修饰的影响也有一定的研究,但是究竟是组蛋白乙酰化激活了基因的转录还是基因转录的激活促进了组蛋白的乙酰化一时之间并不清楚。

随后于1995年,第一个组蛋白乙酰基转移酶HAT1(histone acetyltransferase 1)被Kleff等^[9]人从酵母中分离出,大量科学家对乙酰化修饰进行更加深入的研究发现组蛋白乙酰化修饰是组蛋白乙酰基转移酶(HAT)所催化的。组蛋白乙酰基转移酶的功能主要是对核心组蛋白氨基端尾巴上特定的赖氨酸残基进行乙酰化修饰。修饰的过程是组蛋白乙酰基转移酶将乙酰辅酶A上的乙酰基转移到组蛋白尾巴上某个或某几个赖氨酸 ϵ -氨基基团上^[10],氨基基团的正电荷被中和,而且破坏了它形成氢键的能力^[11],削弱了DNA与组蛋白间的相互作用,有利于其他非组蛋白如转录因子与DNA的结合,促进特定基因转录活性。通常认为组蛋白的高乙酰化状态是活跃转录染色质的重要标志。

HATs按分布区域的不同可以分为两大类:分布于细胞核中的A类和分布于细胞质中的B类^[12]。B类HAT可以使在细胞质中合成的游离组蛋白被乙酰化修饰,然后被修饰的组蛋白转移到细胞核中形成染色体;A类HAT可修饰核小体组蛋白,常与基因转录相关^[13]。

根据结构和性质的不同乙酰基转移酶可以分为四大家族:GNAT 家族、MYST 家族、核受体辅激活物和 TF IIIC 家族,具体分类如表格 2 所示。

表格 2 HAT 及其家族的特征^[12]

Table 2 Characteristics of known and putative HATs

HAT	含有相应HAT的生物	已知的与转录相关的功能	体外是否具有HAT活性	体外重组蛋白对组蛋白的特异性
GNAT 家族				
Hat1	从酵母到人	没有(B型HAT)	是	H4
Gcn5	从酵母到人	辅激活物(接头蛋白)	是	H3/H4
PCAF	人、鼠	辅激活物	是	H3/H4

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.